



11 JUIL. 1997

09/194025

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D	11 AUG 1997
WIPO	PCT

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

27 MAI 1997

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE

## SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 PARIS Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30





INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télecopie : (1) 42.93.59.30

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa  
N° 55-1328

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télecopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>23 MAI 1996</b>		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>96 06630</b>		Cabinet LAVOIX 2, place d'Estienne d'Orves 75441 PARIS Cedex 09	
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>b</b>		N° du pouvoir permanent      références du correspondant      téléphone	
DATE DE DÉPÔT <b>23 MAI 1996</b>		AC/DL      53 20 14 20	
<p><b>2 DEMANDE</b> Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention      <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité      <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p><input type="checkbox"/> autre      <input type="checkbox"/> immédiat</p> <p>demande initiale</p> <p>brevet d'invention</p> <p>certificat d'utilité</p>			
<p>Établissement du rapport de recherche</p> <p>Le demandeur personne physique : requiert le paiement échelonné de la redevance      <input type="checkbox"/> oui      <input type="checkbox"/> non</p>			
<p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p><b>Cellules aviaires immortelles</b></p>			
<p><b>3 DEMANDEUR (S)</b>      <small>N° SIREN</small>      <small>Code APE-NAF</small></p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p><b>RHONE MERIEUX</b></p>		<p>Forme juridique</p> <p><b>SOCIETE ANONYME</b></p>	
<p>Nationalité (s) <b>Française</b></p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p><b>17 Rue Bourgelat 69002 LYON</b></p>		<p>Pays</p> <p><b>FRANCE</b></p>	
<p><b>4 INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs      <input type="checkbox"/> oui      <input checked="" type="checkbox"/> non      <small>En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre</small></p> <p><b>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>      <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois      <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt      <small>Indiquer copie de la décision d'admission</small></p>			
<p><b>6 DECLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE</b></p> <p>date de dépôt      nature de la demande</p>			
<p><b>7 DEMISONS</b> antérieures à la présente demande      n°      date</p>			
<p><b>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (nom et qualité du signataire - n° d'inscription)</p> <p><b>Mandataire Alain COLOMBET</b> CPI n° 95/0306</p> <p><i>1. GL</i></p>		<p>SIGNATURE DU PRÉPOSE À LA RECEPTION      SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</p> <p><i>D. GIPAUD</i></p>	

## Division Administrative des Brevets

## DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

96 06630

Titre de l'invention : **Cellules aviaires immortelles.**

## Le (s) soussigné (s)

RHONE MERIEUX  
17 rue Bourgelat  
69002 LYON - FRANCE

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

BOUQUET Jean-François  
40, chemin de l'Hôpital  
69280 STE CONSORCE - FRANCE

CLEUZIAT Catherine  
16, rue de l'Espérance  
69003 LYON - FRANCE

SAMARUT Jacques  
169 bis, route de Genas  
69100 VILLEURBANNE - FRANCE

DESMETTRE Philippe  
Le Treuil  
35, chemin de la Vernique  
69130 ECULLY - FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire  
Paris, le 8 juillet 1996

CABINET LAVOIX  
M. OBOLENSKY n° 92.1166



5

10

15

### **CELLULES AVIAIRES IMMORTELLES**

20 La présente invention est relative à des lignées de cellules aviaires et leurs dérivés.

L'établissement de lignées cellulaires à partir d'organes prélevés sur les espèces aviaires ne peut être obtenu spontanément, comme c'est le cas avec certains organes 25 provenant d'espèces mammifères.

Les seules lignées cellulaires disponibles jusqu'à maintenant ont été obtenues en utilisant les propriétés transformantes de certains virus aviaires ayant des propriétés oncogènes, tels que les rétrovirus du groupe leucoses aviaires 30 ou le virus de la maladie de Marek, ou de certaines molécules chimiques telles que la méthylcholanthrène et la diéthyl-nitrosamine.

Ces lignées cellulaires présentent, pour la plupart, un caractère de transformation important qui les rend improches à 35 la multiplication de virus vaccinaux.

Des auteurs se sont engagés sur une nouvelle voie consistant à introduire dans les cellules un vecteur ne présentant pas de caractère oncogène mais capable d'intégrer

dans ces cellules un gène choisi pour sa capacité à induire l'immortalisation.

Les premiers essais ont été réalisés à l'aide de vecteurs intégrant des gènes de rétrovirus aviaires tels que erbA, erbB.

5 La demande de brevet français FR-A-2 596 770 propose un procédé d'immortalisation dans lequel on infecte une culture de cellules aviaires ou de mammifères avec un vecteur ou un système ne présentant pas de caractère oncogène pour lesdites cellules mais capable d'intégrer dans ces cellules un gène choisi parmi v-myb, v-ets et v-erbA. Des vecteurs appropriés peuvent être les virus AMV, E26 et XJ12, ce dernier étant un virus dérivé du virus AEV dans lequel le gène v-erbB, oncogène, a été supprimé.

10 Dans la pratique, ces essais ont permis d'obtenir des lignées cellulaires établies à partir de cellules de la lignée hématopoïétique, mais n'ont pas donné les résultats escomptés pour les cellules d'embryon de poulet en culture adhérente telles que les fibroblastes ou les cellules épithéliales.

15 Des lignées de cellules aviaires de type myéloblastoïde (cellules sanguines) non transformées ont pu être obtenues à l'aide de l'oncogène myb (demande de brevet internationale WO91/18971).

20 Parallèlement, des auteurs ont proposé les gènes précoces t et T du virus simien SV40 pour immortaliser des cellules provenant de différents tissus de mammifères (D.S. Neufeld et al., Molecular and Cellular Biology, août 1987, 2794-2802, O. Kellermann et F. Kelly, Differentiation 1986, 32 : 74-81 et demande de brevet français FR-A-2 649 721).

25 La demande de brevet français FR-A-2 649 721 propose de son côté une méthode d'immortalisation conditionnelle qui serait utilisable pour tous les types cellulaires et dans toutes les espèces, l'objectif étant ici de remédier à l'inconvénient de la grande spécificité des voies classiques (limitation à des espèces et/ou à des types cellulaires particuliers) : transformation des cellules par un virus transformant (adénovirus, virus d'Epstein-Barr, certains papovavirus tels que le virus SV40 ou le virus du polyome ; par exemple, le virus SV40 est indiqué comme ne transformant que

les cellules de rongeurs et les cellules humaines) ; transfection avec des constructions contenant un gène transformant lié à un promoteur viral ; transfection avec un gène transformant lié à un promoteur cellulaire. Le choix de cette demande de brevet se porte sur une construction associant un fragment d'ADN de la séquence régulatrice de la vimentine et un fragment d' ADN codant pour un gène immortalisant, qui peut être l'antigène T du virus SV40 sous le contrôle du promoteur, inductible, de la vimentine. Les espèces aviaires ne sont jamais mentionnées dans ce document.

10 Dans l'espèce aviaire, l'utilisation réelle de tels oncogènes viraux n'a jamais été décrite excepté l'utilisation de la forme 12S de la protéine E1A de l'Adénovirus 5 humain qui a permis d'immortaliser des cellules épithélioïdes de caille (Guilhot et al. (1993), Oncogene 8 : 619-624).

15 Contre toute attente, la demanderesse a réussi à produire des lignées cellulaires aviaires, immortelles et non transformées.

20 La présente invention a donc pour objet une lignée cellulaire aviaire immortelle, non transformée, choisie parmi le groupe consistant en :

- lignée TDF-2A bcl-2 déposée à la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur) sous la référence I-1709
- 25 - lignée TCF-4.10 déposée à la CNCM sous la référence I-1710
- lignée TCF-4.10 bcl-2 déposée à la CNCM sous la référence I-1711

30 bcl-2 signifie que les cellules de la lignée intègrent de manière fonctionnelle le gène bcl-2 qui leur confère une résistance à l'apoptose (WO-A-93/20200 incorporée ici par référence).

35 Bien entendu, l'invention couvre les cellules issues de ces lignées. Par cela, il faut comprendre que sont couvertes non seulement les cellules telles que déposées à la CNCM sous les références indiquées, mais aussi les cellules constituant la descendance des précédentes, d'une part celles obtenues par simple multiplication et pouvant subir des mutations lors des multiplications et d'autre part celles obtenues après

modification volontaire, ce qu'on appelle alors les cellules dérivées, et bien sûr celles ayant subi les deux types de modifications.

5 L'invention couvre donc aussi les cellules dérivées obtenues par modifications des cellules ci-dessus. Ces modifications peuvent comprendre :

- Insertion d'une ou plusieurs cassettes d'expression comprenant chacune une ou plusieurs séquences nucléotidiques codant pour une molécule d'intérêt industriel, ces cassettes d'expression étant aptes à produire cette molécule après insertion dans les cellules de l'invention. La technique est parfaitement connue de l'homme du métier. Comme molécules d'intérêt industriel, on peut citer notamment des sous-unités virales de type peptide, protéine, glycoprotéine, notamment à 10 usage de vaccin ou de réactif de diagnostic, des molécules protéiques telles que des hormones, etc.

15 - Infection chronique par un virus apte à se multiplier dans ces cellules, à des fins de production virale ou de vaccin, avec ou sans modification préalable de la sensibilité vis-à-vis de ce virus. L'infection peut aussi ne pas être chronique mais réalisée sur un lot de cellules choisi pour la multiplication virale.

20 (Les modifications qui suivent s'entendent de préférence avantageusement combinées aux deux types précédents).

25 - Introduction de gènes de survie ou anti-apoptose autres que bcl-2 tels que les gènes codant pour les protéines p19E1B de l'adénovirus humain (Rao et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 7742-7746), LMP-1 (Gregory et al. (1991), Nature 349 : 612-614) et BHRF1 (Pearson et al. (1987), Virology 160 : 151-30 161) du virus Epstein Barr, ICP34.5 du virus herpes simplex (Chou et Roizman (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 3266-3270) et p35 du baculovirus (Clem et al. (1991), Science 254 : 1388-1390), afin de rendre ces lignées plus résistantes aux conditions de culture, notamment maintien à confluence.

35 - Surexpression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire par des vecteurs appropriés pour augmenter la vitesse de prolifération. En effet, il a été montré que, dans certains cas, la surexpression de gènes codant pour des

cyclines entraînait un raccourcissement du cycle cellulaire et donc une augmentation de la vitesse de prolifération (Rosenberg et al. (1995), Oncogene 10 : 1501-1509 ; Quelle et al. (1993), Genes and Dev. 7 : 1559-1571).

5 - Modification du spectre de sensibilité virale des lignées par intégration de gènes codant pour des récepteurs de virus d'intérêt, en vue de leur multiplication.

On peut se référer à l'espèce mammifère où l'expression du récepteur du virus de la rougeole (CD46) par des cellules murines, normalement non permissives au virus, entraîne une sensibilité de ces cellules à ce virus et la capacité à le répliquer (Naniche et al. (1993), J. Virol. 67 : 6025-6032). L'intérêt est notamment de rendre les cellules sensibles à un virus afin de le produire sur celles-ci.

15 - Intégration d'oncogènes aptes à accélérer la croissance cellulaire.

Il va de soi que les cellules dérivées selon l'invention peuvent comprendre une ou plusieurs des modifications présentées ci-dessus.

20 L'invention a encore pour objet un procédé de production de molécules d'intérêt industriel ou de virus, comprenant la culture des cellules décrites ci-dessus.

25 Dans le cadre de la présente invention, on s'oriente notamment vers la production de molécules ou de virus pour la réalisation de réactifs de diagnostic ou de vaccins, ou encore de molécules d'intérêt thérapeutique.

30 L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide de modes de réalisation pris à titre d'exemples non limitatifs et se référant au dessin annexé, dans lequel :

35 - la figure 1 montre la structure du vecteur pDAMT servant à préparer la lignée TDF-2A, avec :

LTR : séquence répétée directe (Long Terminal Repeat)

ΔLTR : LTR déletée

MTI : promoteur Metallothioneine I murin

35 SV40 T+t : région précoce SV40

SV40 : promoteur SV40

40 - la figure 2 montre la structure du vecteur pphMT servant à préparer la lignée TCF-4.10, avec :

LTR : séquence répétée directe (Long Terminal Repeat)

phléo : gène de résistance à la phléomycine

SV40pA : polyASV40

MTI : promoteur Metallothionéine I murin

5 SV40 T+t : région précoce SV40

**EXEMPLE 1 = Production de la lignée cellulaire TDF-2A**

**I. Description de son origine et de ses caractéristiques**

10 1.1 Description du vecteur utilisé : vecteur pDAMT  
Il comporte la région précoce du virus SV40 (code pour les  
antigènes T et t) (fragment HindIII/BamHI) (Fiers et al. (1978),  
Nature 273 : 113-120) sous le contrôle du promoteur  
15 métallothionéine I de souris (fragment EcoRI/BglII transformé  
en site HindIII) (Durnam et al. (1980), Proc. natl. Acad. Sci.  
USA 77 : 6511-6515 ; Brinster et al. (1982), Nature 296 : 39-  
42).

20 Le fragment EcoRI/EcoRI contenant cette unité  
transcriptionnelle provenant du vecteur pMTSVneo (Peden et al.  
(1989), Exp. Cell. Res. 185 : 60-72) a été inséré dans le site  
25 KbaI du vecteur pDA1 (Aubert et al. (1991), J. Cell. Biol. 113  
: 497-506). Ce dernier dérive essentiellement du génome du  
virus associé au sarcome de Rous-2 (RAV-2) après modification  
de la LTR située en 3'. En effet, la région U3 de la LTR 3' de  
RAV-2 a été déletée et liée aux régions R et U5 isolées de la  
30 LTR du virus associé au sarcome de Rous-1 (RAV-1). Il porte  
également une unité transcriptionnelle contenant le gène de  
résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur SV40  
dérivant du vecteur pSV2neo (Southern et Berg (1982), J. Mol.  
Appl. Genet. 1 : 327-341). Voir figure 1.

1.2. Etablissement de la lignée et démonstration du caractère immortalisé.

35 Des cellules provenant d'embryons de canard de Barbarie de  
14 jours ont été transfectés par le vecteur pDAMT par la  
méthode utilisant le diméthylsulfoxyde (DMSO) et décrite par  
Kawai et Nishizawa (1984), Mol. Cell. Biol. 4 : 1172-1174. Les  
cellules transfectées sont ensuite sélectionnées par  
application de généticide G418 (150 µg/ml) pendant 15 jours.

5 Les clones résistants sont alors subcultivés régulièrement à raison de 1 à 2 passages par semaine. Après cette période de prolifération active de 3 mois, les cellules sont entrées dans une période de crise durant laquelle la plupart des cellules sont mortes. Après cette période qui a duré environ 2 mois, plusieurs clones ont repris une prolifération active suggérant leur immortalisation.

10 La lignée cellulaire TDF-2A est issue ainsi de 2 cultures. Elle a été étudiée de manière plus approfondie.

15 Les cellules TDF-2A ont atteint 200 passages soit environ 460 générations et ont été ainsi maintenues en culture pendant plus de 600 jours en continu. Comparativement, des cellules témoins, n'exprimant pas la région précoce du virus SV40 ne peuvent être maintenus en culture plus de 20 passages.

### 1.3. Caractéristiques de prolifération.

20 Les cellules immortalisées sont cultivées à 38°C, en flacon roulant, dans un milieu contenant du HAM F-10 10X à 6%, 199 HANKS 10X à 4%, Tryptose Broth Phosphate 2,95 % à 4%, Bicarbonate de sodium 5,6% à 2,5%, vitamine BME 100K à 0,1%, sérum de veau foetal à 3%, Kanamycine 5% à 1%, Vancomycine 0,5% à 1%.

25 Dans ces conditions, leur taux de doublement est de 1 par 24 heures.

### 1.4. Expression de l'antigène T.

30 Par immunofluorescence ou immunophosphatase indirectes en utilisant un anticorps spécifique de l'antigène T (Pab 101 : Santa Cruz Biotechnology ref. sc147), il a été vérifié que toutes les cellules expriment l'antigène T dans leur noyau, indiquant qu'elles ont toutes intégré le vecteur.

35 Cette intégration a d'ailleurs été montrée par Southern-blot. L'ADN génomique des fibroblastes immortalisés a été digéré par les enzymes de restriction XbaI, BstXI. L'hybridation avec une sonde spécifique de l'antigène T (fragment NdeI/NdeI de 1018 pb) a permis de vérifier que l'unité transcriptionnelle permettant l'expression du gène immortalisant, insérée dans les cellules TDF-2A, n'avait pas subi de remaniements majeurs. En effet, la taille des fragments

d'hybridation obtenus est conforme à celle attendue.

#### 1.5. Absence de pouvoir tumorigène.

Les cellules immortalisées ne présentent pas de pouvoir tumorigène. Elles sont incapables de former des colonies en milieu semi-solide ou de former des tumeurs sur membrane chorioallantoïdienne d'oeufs de poule ou de cane. Elles sont également incapables de former des tumeurs sur souris nue (souris "nude"), sur poussins et canetons SPF (exempts d'organismes pathogènes) de 1 jours.

#### 1.6. Caryotype.

Le caryotype des cellules TDF-2A a été étudié aux 114ème et 135ème passages. Il a permis de vérifier que les cellules étaient bien d'origine aviaire avec la présence de microchromosomes caractéristiques de cette espèce. De plus, les chromosomes observés sont représentatifs des chromosomes rencontrés dans les cellules primaires d'embryons de canard confirmant ainsi l'origine de la lignée.

## II. Propriétés.

Les cellules TDF-2A présentent notamment une sensibilité aux virus spécifiques du canard tels que l'adénovirus, le parvovirus et le reovirus qui sont habituellement répliqués sur cellules primaires d'embryons de canard. On peut donc produire ces virus sur cette lignée.

#### EXEMPLE 2 : Caractérisation de la lignée TDF-2A par identification des sites d'intégration.

L'ADN génomique des cellules TDF-2A, préparé à partir des cellules provenant du 114ième et du 135ième passages, a été digéré par les enzymes de restriction BglII et KpnI. L'ADN ainsi traité est alors soumis à une électrophorèse sur gel, suivie d'un transfert sur membrane de nylon, puis hybridé avec une sonde spécifique de l'antigène T (fragment NdeI-NdeI de 1018 pb). Ainsi, la digestion par BglII permet d'obtenir deux bandes d'hybridation de haute taille (d'environ 15 et 23 kb) suggérant l'existence de deux sites d'intégration. La digestion par KpnI entraîne l'obtention d'une bande majoritaire de haute taille (environ 20 kb) et d'au moins une bande minoritaire

confirmant l'existence d'au moins deux sites d'intégration.

**EXEMPLE 3 : Production de la lignée cellulaire TCF-4.10**

1. Description de son origine et de ses caractéristiques

5 1.1. Description du vecteur utilisé : vecteur pphMT

Il comporte la région précoce du virus SV40 (code pour les antigènes T et t) (fragment HindIII/BamHI) (Fiers et al. (1978), Nature 273 : 113-120) sous le contrôle du promoteur métallothionéine I de souris (fragment EcoRI/BglII transformé en site HindIII) (Durnam et al. (1980), Proc. natl. Acad. Sci. USA 77 : 6511-6515 ; Brinster et al. (1982), Nature 296 : 39-42).

Le fragment EcoRI/EcoRI contenant cette unité transcriptionnelle provenant du vecteur pMTSVneo (Peden et al. (1989), Exp. Cell. Res. 185 : 60-72) a été inséré dans le site EcoRI du vecteur pUT507 (commercialisé par CAYLA-FRANCE) situé en 3' de la région permettant l'expression du gène de résistance à la phléomycine (figure 2). La structure du vecteur pUT507 est décrite dans Mulsant et al. (1988), Somatic Cell and Molecular genetics 14 : 243-252.

1.2. Etablissement de la lignée et démonstration du caractère immortalisé.

Des fibroblastes provenant d'embryons de poulet ont été transfectés par le vecteur pphMT par la méthode utilisant le diméthylsulfoxyde (DMSO) et décrite par Kawai et Nishizawa (1984), Mol. Cell. Biol. 4 : 1172-1174. Les cellules transfectées sont ensuite sélectionnées par application progressive (de 10 µg/ml à 50 µg/ml) de phléomycine pendant 15 jours. Les clones résistants sont alors subcultivés régulièrement à raison de 1 à 2 passages par semaine. Après une période de prolifération active d'environ 2 mois, les cellules sont entrées dans une période de crise où la croissance cellulaire est très faible et durant laquelle la mortalité est très élevée. Après une période qui a durée de 3 à 4 mois, quelques cellules du clone TCF-4.10 ont repris une prolifération active suggérant leur immortalisation.

Les cellules TCF-4.10 ont atteint ainsi 200 passages en culture soit environ 400 générations et ont été maintenues en

culture pendant 3 années. Comparativement, des fibroblastes témoins, n'exprimant pas la région précoce du virus SV40 ne peuvent être maintenus en culture plus de 20 à 30 passages.

### 1.3. Caractéristiques de prolifération.

5 Les fibroblastes immortalisés sont cultivés à 38°C dans un milieu HAM F-10 10X à 6%, 199 HANKS 10X à 4%, Tryptose Broth Phosphate 2,95% à 4%, Bicarbonate de sodium 5,6% à 2,5%, vitamine BME 100X à 0,1%, sérum de veau foetal à 3%, Kanamycine 5% à 1%, Vancomycine 0,5% à 1%. Dans ces conditions, leur taux 10 de doublement est de 0,7 par 24 heures.

### 2.2. Expression de l'antigène T.

Par immunofluorescence ou immunophosphatase indirectes en utilisant un anticorps spécifique de l'antigène T (Pab 101 : 15 Santa Cruz Biotechnology ref. sc147), il a été vérifié que toutes les cellules expriment l'antigène T dans leur noyau, indiquant qu'elles ont toutes intégrés le vecteur.

### 2.3. Absence de pouvoir tumorigène.

Les fibroblastes immortalisés ne présentent pas de pouvoir tumorigène. Ils sont incapables de former des tumeurs sur 20 membrane chorioallantoïdienne d'oeufs de poule ou de cane.

### 3. Propriétés.

Les cellules TCF-4.10 présentent notamment une sensibilité aux virus aviaires. On peut citer notamment les Poxvirus aviaires tels que le Canary-pox, le Fowl-Pox, ou encore le 25 virus HVT (Marek sérotype 3), le virus de la maladie de Gumboro. On peut donc produire ces virus sur cette lignée.

#### EXEMPLE 4 : Multiplication du Canary-Pox sur cellules TCF-4.10.

30 Les cellules TCF-4.10 sont ensemencées en flacon roulant. Le Canary-Pox est inoculé sur tapis établi. Lorsque l'effet cytopathique engendré par le virus est généralisé, la récolte est effectuée par agitation de façon à décoller le tapis cellulaire. Celle-ci est donc composée du tapis cellulaire et 35 de surnageant de culture. L'ensemble est homogénéisé par un traitement ultraturrax pendant 1 mn à 13 500 tours/mn (appareil IKA type T25).

La détermination du titre viral infectieux est réalisée en

microméthode sur plaque de 96 puits. Les dilutions de virus sont inoculées sur tapis établi de cellules secondaires d'embryons de poulet. Chaque dilution virale est inoculée sur 6 cupules. Les plaques sont placées en incubation dans un incubateur à CO<sub>2</sub> pendant 8 jours. La présence de virus dans les cupules est contrôlée au microscope en observant l'effet cytopathique (ECP) caractéristique. Le titre infectieux est calculé selon la méthode de KARBER et est exprimé par le logarithme de l'inverse de la dilution virale donnant 50% d'ECP [Titre =  $d+r/Nx(n+N/2)$ ] avec d égal à la dilution exprimée en log où il y a 100% de cupules positives, r égal à la raison de la dilution, N égal au nombre de cupules par dilution et n égal au nombre de cupules positives entre 0 et 100%].

Résultats : Les titres viraux obtenus sont équivalents à ceux obtenus sur cellules primaires d'embryons de canard.

#### EXEMPLE 5 : Intégration du gène bcl-2

Un vecteur permettant l'expression du gène bcl-2 sous le contrôle du promoteur CMV (Cytomegalovirus humain) est transfété dans les cellules TDF-2A et TCF-4.10 en utilisant les méthodes classiques de transfection (méthode au DMSO décrite par Kawai et Nishizawa (1984), Mol. Cell. Biol. 4 : 1172-1174 ou lipofectamine suivant les recommandations du fournisseur GIBCO-BRL).

Après sélection des cellules transfectées, l'expression de la protéine Bcl-2 est détectée par western-blot.

Les cellules exprimant la protéine Bcl-2 sont alors testées pour leur capacité à survivre dans des conditions de culture où un processus d'apoptose est observé (maintien des cellules à confluence).

Ainsi, dans le cas des cellules TDF-2A bcl-2, le processus d'apoptose engendré par l'arrivée des cellules à confluence est différé de 3 à 4 jours par rapport aux cellules TDF-2A. Dans le cas des cellules TCF-4.10 bcl-2, une augmentation de la densité cellulaire à confluence est observée par rapport aux cellules TCF-4.10.

## REVENDICATIONS

1. Lignée cellulaire aviaire immortelle, non transformée, choisie parmi le groupe consistant en :

5 - lignée TDF-2A bcl-2 déposée à la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur) sous la référence I-1709.

- lignée TCF-4.10 déposée à la CNCM sous la référence I-1710

10 - lignée TCF-4.10 bcl-2 déposée à la CNCM sous la référence I-1711.

2. Cellules aviaires immortelles issues de la lignée cellulaire selon la revendication 1.

3. Cellules selon la revendication 2, caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins une cassette d'expression 15 comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour une molécule d'intérêt industriel.

20 4. Cellules selon la revendication 3, caractérisées en ce que la séquence nucléotidique code pour une sous-unité virale de type peptide, protéine, glycoprotéine ou pour des molécules protéiques telles que des hormones.

5. Cellules selon la revendication 2, caractérisées en ce qu'elles sont infectées, de préférence chroniquement, par un virus apte à se multiplier dans ces cellules.

25 6. Cellules selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisées en ce qu'elles contiennent un gène de survie ou anti-apoptose autre que bcl-2, de préférence choisi parmi le groupe consistant en p19E13 de l'adenovirus humain, LMP-1 du virus Epstein Barr, BHRF1 du virus Epstein Barr, ICP34.5 du virus herpes simplex et p35 du baculovirus.

30 7. Cellules selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisées en ce qu'elles intègrent des vecteurs aptes à surexprimer un ou des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire afin d'augmenter la vitesse de prolifération.

35 8. Cellules selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, caractérisées en ce qu'elles intègrent des gènes codant pour des récepteurs viraux.

9. Cellules selon l'une quelconque des revendications 2 à 8, caractérisées en ce qu'elles intègrent des oncogènes aptes

à accélérer la croissance cellulaire.

10. Procédé de production de molécules d'intérêt industriel ou de virus, comprenant la culture de cellules selon l'une quelconque des revendications 2 à 9.

5

10

15

20

25

30

35

1/1

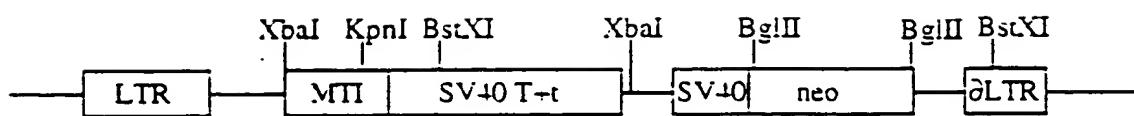


FIG. 1

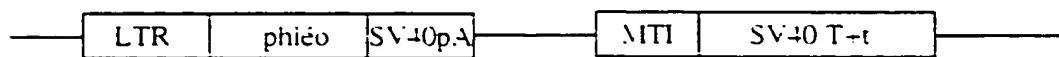


FIG. 2